Medical Library

Aus dem Patholog. Institut der Universität München.
(Direktor: Geheimrat Professor Dr. Borst.)

Untersuchungen am Knochensystem jugendlicher Tiere nach Injektion natürlicher und künstlicher Porphyrine.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin verfaßt

und einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Bayer. Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

EBERHARD EMMINGER

aus Augsburg.

München 1932

Druck: Paul Denk, Johannisplatz 16.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153312_0173

In mehreren Arbeiten der letzten Jahre wurde auf die besondere Affinität des Porphyrins zum wachsenden Knochen hingewiesen; so war es zuerst E. Fränkel, dann Borst-Königsdörffer u. a. gelungen, eine Ablagerung des injizierten, aus dem Harn von Petry gewonnenen Porphyringemisches im Knochensystem des jugendlichen Tieres zu erzielen. Neuerdings war es Hammer, der, im Gegensatz zu anderen Forschern, berichten konnte, auch mit Hämatoporphyrin, das synthetisch aus Rinderblut gewonnen worden war, ähnliches erreicht zu haben. Unsere Versuche nun sollten sich auf die Frage des Aufziehvermögens verschiedener Porphyrine auf den Knochen erstrecken und gleichzeitig die wiedersprechenden Angaben zu klären versuchen. Wir beschränken uns dabei auf die Anwendung optischer Methoden mit den uns zur Verfügung stehenden Apparaten wie Quarzanalysenlampe, Fluoroszenzmikroskop- und spektroskop, während chemische Analysen nicht vorgenommen wurden.

Das durch die hiezu notwendigen Injektionsversuche gewonnene Tiermaterial wollten wir außerdem gleichzeitig verwenden zur Untersuchung der verschiedenen Wachstumszonen des Porphyrinknochens, worauf Schmorl anläßlich seiner Untersuchungen an einem 10 Monate alten Porphyrinschwein nachdrücklich hingewiesen hatte.

Nachfolgende Untersuchungen wurden unternommen auf Anregung von Herrn Geheimrat Borst; Herr Dr. Fikentscher hatte die Freundlichkeit, mich in den Gebrauch der Apparate einzuführen.

Bevor wir jedoch auf unsere eigenen Versuche näher eingehen, erscheint es uns, um genaue Vergleichungsmöglichkeiten zu haben, notwendig und nützlich, auf die bisher unternommenen Injektionsversuche am wachsenden Tier kurz einzugehen.

E. Fränkel verwandte aus Petryharn hergestelltes Porphyringemisch in einer Konzentration von 0,5 — 1 %, gelöst in wässriger Sodalösung. Die Injektionsmenge betrug täglich 1,0 bis

1,5 ccm, bis zu 28 Injektionen im Ganzen. Es gelang ihm so eine kirsch-burgunderrote Färbung des wachsenden Tierknochens zu erzielen; ebenso erfolgte eine Färbung des Kallus im Bereich der künstlich gesetzten Frakturen am ausgewachsenen Tier.

E. G. van Leersum berichtet über Versuche, denen zufolge er mit mehrfacher Injektion von 3—10 mg Salzsäure Haematop. in alkalischer Lösung — „zontzure haematoporphyrine in den alkalische oplossing" — eine Heilung der künstlich erzeugten Rachitis bei Ratten erzielen konnte.

H. Fischer stellte fest, daß reines Uroporphyrin auf den Knochen des wachsenden Tieres aufzieht; und zwar genügte eine einzige Injektion von 50 mg Urop. auf 170 g Meerschwein bereits, um eine braunrote Skelettfärbung zu erzielen. Tastversuche mit anderen Porphyrinen fielen alle negativ aus. Nur mit Isourophyrin, gelöst in wässriger Natriumbikarbonatlöung, konnten Fischer und Heisel nach Einverleibung von 55 mg Isourop. eine Rotfärbung des Skelettes erzielen.

Borst-Königsdörffer nahmen im Anschluß an die Fischerschen Versuche Untersuchungen mit verschiedenen Porphyrinen vor. Verwendet wurden 1 % ige Farbstofflösungen in no 1/100 Kalilauge. Injiziert wurden je 0,3—0,6 ccm zwei bis drei mal wöchentlich, bis zu 45 Injektionen pro Tier als Maximum. Positive Resultate wurden nur mit Urophyrin erzielt: Ooporphyrin, Koproporphyrin und die künstlichen Porphyrine lieferten keine Färbung jugendlicher Knochen und Zähne; auch chemisch-physikalisch war eine Porphyrinablagerung dort nicht nachzuweisen.

H. Hammer benützte bei seinen Versuchen eine aus Rinderblut nach Willstätter hergestellte Hämatoporphyrinlösung von 0,5—1 % Farbstoffgehalt, gelöst in dünner wässriger Sodalösung; die Injektionsmenge betrug täglich zwischen 0,5 und 2,0 ccm. Er konnte damit in allen Fällen eine Färbung des Skeletts und der Zähne erzielen, eine Braunfärbung, die durch Porphyrin bedingt sein mußte, was durch Rückgewinnung des P. aus den Knochen chemisch exakt bewiesen werden konnte. Allerdings mußten mindestens 200 mg Farbstoff injiziert werden.

Neuestens konnte H. Pflüger über Ablagerungen von Porphyrin im Dentin, festgestellt im ultravioletten Licht, berichten. Er hatte hiezu eine 0,75 % ige Uroporphyrinlösung verwandt und junge 5 Wochen alte Hunde etwa alle 2 Tage mit 1,75 ccm Lösung gespritzt, bis insgesamt 10 Injektionen pro Tier.

Versuche, mit der gleichen Methodik eine Ablagerung des Porphyrins auch im Knochen ausgwachsener Tiere zu erzielen, haben, wie Fränkel, Borst, Königsdörffer und Hammer berichten konnten, zu einem positiven Ergebnis nicht geführt.

Soweit die uns bekannten Injektionsversuche mit Porphyrinen. Jedenfalls können wir aus dieser Zusammenstellung von Untersuchungen trotz einzelner Verschiedenheiten als Gemeinsames feststellen, daß eine Porphyrinablagerung nur im wachsenden Knochen vorzukommen scheint.

Bei unseren Versuchen nun verwandten wir folgende Porphyrine: Uroporin, Isourophyrin, Haematop., Koprop. und Deuteroporphyrin und zwar in folgenden Konzentrationen:

Aus einem Rest von Uroporphyrinlösung wurde das P. gefällt und dannn zu einer Farbstofflösung 1 : 1000 mit 1 % iger Natriumbikarbonatlösung verdünnt.

Isouroporphyrin 0,2 ‰ ig gelöst in 1 % ig Nabikarbonatlösung, 1,0‰ ig in 0,2 % iger Na OH Lösung, 2,0‰ ig in 0,5‰ ig Na OH Lösung und 4,0 ‰ ig in 1 % ig Na HCO_3 - Lösung.

Hämatoporphyrin 1 ‰ ig, dann 3 ‰ ig, später 5 ‰ ig in jeweils 1 % iger HKC_3 - Lösung gelöst, außerdem 1 % ig in 1 % iger Sodalösung gelöst.

Bei den Versuchen mit Koproporphyrin wurde verwendet eine 1 ‰ ige Farblösung, zu deren Verseifung 1 ccm einer 1 % igen Na OH-Lösung benützt wurde; restliche Verdünnung mit aq. dest; weiter eine 4 ‰ ige gelöst in 1 ccm NO 1/10 KOH Lösung verdünnt mit aq. dest.

Die Deuteroporphyrinversuche wurden ausgeführt mit einer 1 ‰ igen Farblösung; als Lösungsmittel wurde 1 % ige Na HCO_3 verwandt.

Alle Lösungen wurden sorgfältig filtriert, im Dampfbad bei 100° 30 Minuten lang erhitzt und in sterilen braunen Gläsern verwahrt. Unsere Spritzen und Nadeln, aus verchromtem Stahl, wurden jeweils vollkommen steril verwandt, sodaß wir, soweit überhaupt möglich, unter den günstigsten Verhältnissen unsere Einspritzungen vornehmen konnten. Die Tiere, die in Würfen abgesondert in einzelnen Ställen untergebracht waren, und mit Heu, Zuckerrüben und Hafer gefüttert wurden, vertrugen so tatsächlich die meist täglichen Injektionen sehr gut, so daß keines von ihnen an Infektion einging; Wunden, die sich die Tiere, durch den Juckreiz der Injektion veranlaßt, selbst durch Kratzen beigebracht

hatten, heilten nach Aussetzen der Injektionen rasch ab. Die Meerschweinchen wurden vom 3. Tage an, Kaninchen vom 15. Tage, Hunde vom 17. Lebenstage an durchschnittlich sechs mal in der Woche subkutan am Bauch gespritzt. Die einzelnen Injektionsdosen schwankten zwischen 1 / 10 mg und 5 mg Porphyrin in den oben angegebenen Konzentrationen, so daß die jeweilige Einzelmenge, an Injektionsflüssigkeit 0,5 — 2,0 ccm betrug.*) Dabei war unser Bestreben, mit allerniedrigsten Mengen, Konzentrationen, die ein Zehntel und weniger der bisher in der Literatur angegebenen Stärke betrugen, uns langsam in den tierischen Organismus einschleichen, um einerseits eine bestmögliche Ausnützung des Farbstoffes zu erreichen, anderseits aber auch die Wirkung kleinster Mengen beobachten zu können. Erst gegen Ende einzelner Versuche injizierten wir pro Dosis auch mehrere Milligrammata, natürlich nur bei den uns hiezu geeignet erscheinenden Versuchstieren. Selbstverständlich mußten wir, um bei so geringen Konzentrationen auch genügend Porphyrin in den Organismus einzuführen, unsere Versuche etwas länger ausdehnen, so daß einzelne Tiere bis über 70 mal insgesamt gespritzt wurden. Daß die von uns verwandten alkalischen Pufferlösungen gut vertragen wurden, hatten wir zuerst in einer Versuchsreihe mit den verschiedenen verwandten Konzentrationen an Meerschweinchen festgestellt. Auch hatten wir zu jedem Versuch unsere Kontrolltiere vom gleichen Wurf, außerdem wurden zur Gewichts- und Farbtönungskontrolle immer noch Tiere aus den allgemeinen Ställen herangezogen. An weiteren technischen Einzelheiten ist noch wichtig, hier mitzuteilen, daß unsere sämtlichen Versuchs- und Kontrolltiere jeweils ohne irgend welche chemischen Agentien skelettiert wurden; wir entfernten die gesamte Muskulatur mit Messer und Schere und bewahrten die Knochen teils trocken, teils in 96 % igem Alkohol auf. Auf diese Weise bekamen wir nur chemisch ganz unbeeinflußtes Material zur Untersuchung. Zur Untersuchung standen uns zur Verfügung eine Quarzanalysenlampe, Orig. Hanau: die vom Quecksilberbrenner gelieferten und durch ein Uviolglas gefilterten ultravioletten Strahlen regen Porphyrin zu intensiver, purpurroter Fluoreszenz an. Dabei ist die Methode schon sehr empfindlich, da schon Spuren von

*) Nur bei einer zweiten Serie von Haematoporphyrininjektionen, bei der wir eine 1 %ige Porphyrlösung verwandt, hatten, betrug dann die höchste Einzeldosis an Porphyrin 20 mg.

Porphyrin, am Tageslicht kamen oder überhaupt nicht wahrnehmbar, eine Rotfluoreszenzgeben. Zur eingehenden Uutersuchung verwenten wir dann das Fluoreszenzmikroskop nach Borst-Königsdörffer von Reichert- Wien, dem ein Spektroskop von Steinheil-München beigegeben ist, so daß sofort jedes Ergebnis, eine Rotfluoreszenz zum Beispiel, auf ihre tatsächliche Porphyrinnatur kontrolliert werden kann.

I.

Nach diesen die Methodik der Versuche betreffenden Bemerkungen können wir im Einzelnen auf Ergebnisse unserer Untersuchung bezüglich des ersten Teiles unserer Arbeit, des Aufziehvermögens auf den Knochen verschiedener Porphyrine, eingehen; wir haben dabei den in der Literatur gebräuchlichen Begriff des „Aufziehvermögen" der Porphyrine verwandt und verstehen darunter die bei jugendlichen Tieren durch Porphyrininjektion erzielte typische (Anfärbung, bezw.) Ablagerung des Porphyrins gerade im Knochensystem. Aus Gründen der Raumersparnis müssen wir es uns versagen, die über jedes einzelne unserer über 70 im Versuch befindlichen Tiere geführten Protokolle zu beschreiben; wir können nur zusammenfassend das Wichtigste berichten:

Zunächst ist zu erwähnen, daß fast alle Tiere die Injektionen gut vertrugen und immer gut gediehen; leider gingen einzelne Tiere an einer durch winterlichen Witterungssturz verursachten Pneumonie zu Crunde. Alle unsere Hunde, mehrere Kaninchen und einzelne Meerschweinchen nahmen so regelmäßig zu wie die Kontrolltiere. Bei der großen Mehrzahl der Meerschweinchen machten sich allerdings Wachstumshemmungen bemerkbar; das fiel besonders auf bei den mit Deuteroporphyrin gespritzten Tieren, die nach ca. 1 Monat im Vergleich zu den Kontrolltieren merklich zurückblieben. Bei den Kopro- und Isouroporphyrintieren verläuft die Gewichtskurve etwas flacher als bei den Kontrolltieren desselben Wurfes; hieran ist sicherlich die tägliche Einspritzung, eine zweifellose Belastung für die Tiere, in eben demselben Maße verantwortlich zu machen, wie eine schädigende Wirkung durch das Porphyrin selbst. Die mit Haematoporhyrin gespritzten Tiere gediehen zunächst sehr gut, bei Anwendung höherer Konzentrationen erst stellten wir Wachstumshemmungen fest, obwohl alle Tiere ziemlich regelmäßig, nur eben täglich weniger als ein Kontrolltier,

zunahmen. Sensibilierungserscheinungen, wie sie W. Hausmann bei weißen Tieren bei den hiezu von ihm eigens unternommenen grundlegenden Versuchen festgestellt hatte, haben wir bei unseren durchwegs dunkel behaarten Tieren nie beobachten können: auch dann nicht, wenn wir die Tiere, was ja fast täglich geschah, in den sehr hellen Operationsraum zu den Injektionen brachten oder sie unter die Strahlen der Quarzanalysenlampe hielten. Wir müssen dabei hinzufügen, daß wir eigene Sensibilierungsversuche natürlich nicht unternommen haben. Haarausfall oder andere beschriebene Auffälligkeiten haben wir in keinem unserer Fälle gefunden. Nur schien es uns. als ob einzelne Tiere von der 30. bis 40. Injektion ab viel unruhiger wurden.

Unser Hauptaugenmerk richtete sich naturgemäß auf die Beobachtung und Untersuchung des Knochensystems. Eine wichtige Kontrolle über die Aufziehverhältnisse am lebenden Tier boten die Untersuchungen der Zähne unter der Quarzlampe, die in regelmäßigen Abständen vorgenommen wurden.

Bei den nach verschiedenen Zeitabständen getöteten Tieren ergab die Sektion im Allgemeinen folgendes: Die Größe aller Organe wechselte bei den Tieren je nach ihrem Gewichtsstande bei der Entblutung, auffallende Unterschiede im Vergleich zu Normaltieren wurden nicht gefunden. Es fanden sich bei fast allen Tieren Verwachsungen im Bereich der Inlektionsstellen zwischen Haut und Muskulatur; dort war auch meist eine deutlich sichtbare Braunfärbung, wohl veranlaßt durch hier abgelagerten Farbstoff, vorhanden. Sonst konnten wir jedoch nirgends auffallende Farbunterschiede der innereren Organe im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen. Bemerken müßen wir, daß wir bei manchen unserer ganz normalen Kontrolltiere eine am Tageslicht beobachtete stärkere Braunfärbung des Skeletts gesehen kaben. Andererseits zeigten die weitaus größte Mehrzahl unserer Versuchstiere keine auffallenden Farbtönungen des Knochensystems, auch nach längeren Injektionsversuchen. Es schien uns daher unbedingt notwendig bei unseren Versuchen nur dann jeweils von Porphyrin zu sprechen, wenn wir gleichgültig, ob dunklere oder hellere Skelettfärbung bei Tageslichtbetrachtung vorlag, eine deutliche Rotfluorenz im gefilterten U.-V.-Licht bekamen und diese wieder fluoreeszenzspektroskopisch als Porphyrinfluoreszenz indentifizieren konnten.

Im Einzelnen konnten wir bei unseren Isouroporphyrin-Tieren folgendes feststellen.

Die ersten Erscheinungen am lebenden Tier beobachteten wir nach 0,0014 — 0,003 g Isop. als Rotfluoreszenz der unteren Nagezähe, erst ab 0,012 g Isop. konnten wir eine am Tageslicht sichtbare Braunfärbung der Unterzähne feststellen. Schließlich fanden wir nur in zwei Fällen eine intensivere Braunrärbung des Skelettes am Tageslicht, als dies bei den Kontrolltieren der Fall war. Trotzdem fluoreszieren die sämtlichen Skelette der Versuchstiere unter der Quarzlampe gleichmäßig leuchtend rot. Es ist dies jeweils ein Rotaufleuchten des gesamten Knochensystems, das umso stärker ist, je sorgfältiger das Skelett von Muskulatur und Periost befreit ist. Beim Schnitt durch Röhrenknochen leuchten die compacta und alle Spongiosabälkchen stark rot, während das Knochenmark violett-schwarz fluoresziert. Stark hebt sich hievon ab die blauviolette Fluoreszenz aller nicht knöchernen Partien (Knorpel, Zwischenwirbelscheiben, Gelenkkapsel).

Wir haben diese äußerst starke Fluoreszenz auch dann gefunden, wenn wir die Tiere erst mehrere Tage nach Beendigung der Injektionen töteten. Freilich scheint die Intensität der Fluoreszenz auch wesentlich davon abzuhängen, ob genügend große Mengen an Porphyrin entspechend dem Körpergewicht zugeführt werden. So hatte ein Meerschwein (Tier 1) bei einem Endkörpergewicht von 422 g insgesamt 0,0797 g Isourop. erhalten, ein Hund (Tier 14) von 12 200 g Endgewicht ebensoviel. Der Unterschied war auffallend: Purpurrote Fluoreszenz beim Meerschwein und zartrosa Fluoreszenz beim Hund. Ähnliche Ergebnisse hatten wir bei allen anderen Tieren auch finden können. Die Kontrolltiere ergaben in allen Phasen negative Befunde: Fahlgelbe Fluoreszenz sämtlicher Knochenteile, Blaufluoreszenz aller Knorpelpartien, spektroskopisch kein Hinweis auf irgendwelche Porphyrinbefunde; die bei einzelnen Kontrolltieren festgestellte leichte Braunfärbung des Skeletts hat somit mit Porphyrin nichts zu tun.

Bei unseren Versuchen mit Koproporphyrin stellten wir folgendes fest: Nach 0,004 g — 0,007 g Koprop. zeigten sich die ersten auffallenden Fluoreszenzerscheinungen an den Zähnen lebender Tiere. Nach 0,015 g, bei anderen nach ca 0,025 — 0,03 g Injektionsmenge — das war nach der 20. bis 30. Injektion — waren diese Erscheinungen verschwunden. [Kurz vorher, nach der 19 Injektion bei 0,0125g, Meerschweinchen (Tier 25) im Alter von 1 Monat

2 Tagen und Gewicht von 308 g, war gerade ein Maximum der Fluoreszenz der Zähne im U.-V.Licht festgestellt worden.] Das Sektionsergebnis fiel dementsprechend negativ aus: Keine Verschiedenheiten des Farbtons am Skelett, auch bei länger dauernden Versuchen, zwischen Kontroll- und Versuchstier bei Tageslichtbetrachtung. Im U.-V.-Licht fluoreszieren die Skelette alle fahlgelb wie die der Kontrolltiere, Knorpel jeweils blau.

Unsere mit Deuteroporphyrin gespritzten Tiere ließen trotz regelmäßiger andauernder Kontrolle unter der Quarzlampe keinerlei Fluoreszenzerscheinungen der Zähne zu erkennen. Da die Tiere, wie eingangs schon erwähnt, ziemlich schnell und stark auf die Injektionen mit dem Zurückbleiben des Gewichtes reagierten, gingen wir schließlich mit unseren täglichen Injektionsmengen bis auf 0,0005 g und 0,00025 g Deuteroporphyrin herunter; vorüber gehend erzielten wir dadurch Besserung; die im ganzen stark zurückgebliebenen Tiere ließen aber nach der Sektion weder bei Tageslicht noch im U.-V. Licht irgendwelche Abweichungen von den hiezu gehörigen Kontrolltieren erkennen.

Unsere Versuche mi Uroporphyrin ergaben folgendes:

Wir beabsichtigten, die wenigen ccm, die uns aus einer alten Restlösung zur Verfügung standen, zur Färbung für ein größeres Tier zu verwenden. Nachdem wir so einem jungen Hund, No. 20, 0,05 g injiziert hatten, mußten wir am sorgfältig präparierten Skelett feststellen, daß bei Tageslicht normale Knochenfarbe vorhanden war, die Knochen zeigten keinen Unterschied in der Farbe von einem gleich alten, noch dazu vom gleichen Wurf stammende Kontrolltier. Im U.-V. Licht fanden wir äußere Compakta und Spongiosa dunkelviolett-schwarz, manchmal bräunlich, während die tieferliegenden Kompaktaschichten ganz schwach violettrosa aufleuchteten, jedenfalls deutlich anders als die fahle Fluoreszenz des Normaltieres. Wesentlich einfacher war der Befund nach einer Injektion von 0,001 g Urop. als 1 ‰ ige Lösung bei einem Meerschweinchen No. 12. Am nächsten Tage fand sich zwar bei Tageslichtbestrahlung nichts auffälliges, unter der Quarzlampe aber eine deutliche Rotfluoreszenz der unteren Nagezähne, die sich stark von der nur mehr die Zahnspitzen betreffenden violettrosa Fluoreszenz des gleich alten Kontrolltieres unterschied. Nach 55 Tagen immer noch Rosafluoreszenz, nach 3 Monaten Skelett gelblich braun, im U.-V. Licht gelblich, nur die äußersten Spitzen der unteren Nagezähne leicht rosarot.

Unsere Hämotporphyrintiere gaben einen sehr wechselnden Befund: Unsere Hunde No. 15 und No. 16, deren Zähne in vivo nur ganz leicht gegen das Zahnfleisch zu bläulich-rosa unter der Quarzlamge leuchteten, zeigten nach der Sektion keine Abweichung bei Tageslicht in ihrem Knochensystem von gleich alten Vergleichshunden. Unter der Quarzlampe fand sich bei der Gesamtdosis von 0,18 — 0,21 g H. P. nur eine ganz schwache Rosafärbung der Compakta. Die Spongiosa ließ nur wenig Rot, eigentlich richtiger: ein tief dunkles Violett-Rot erkennen; lediglich an den Fußwurzelknochen sahen wir ein helleres Rosa-Rot. Einen anderen Befund konnten wir bei den Meerschweinchen und Kaninchen erheben: z. B. ein Tier, No. 21, läßt eine schwache helle Rosafluoreszenz mancher Knochenpartien erkennen.

Ein anderes Tier, Meerschweinchen, No. 22, ließ bei einer Injektionsdosis von insgesamt 0,0035g eine deutliche Rosafluoreszenz der Nagezähne in vivo erkennen; bei der Dosis von 0,006 g sah man eine leichte Brauntönung der Zähne am Tageslicht, bei noch höherer Menge war das Skelett normal knochengefärbt, unter der Quarzlampe diffus schwach rosa leuchtend, wobei wiederum streifenförmige nicht leuchtende Knochenpartien gefunden wurden. Im Gegensatz dazu ein weiteres Tier (No. 29), das zwar nach einer Dosis von 0,006 g (HP) eine Rosafluoreszenz der Zähne zeigt, dessen Skelett aber nach insgesamt Injektionsmenge 0,012 g keine Rotfärbung unter der Quarzlampe nach der Sektion erkennen ließ. Noch interessanter war der Befund bei einem sehr gut wachsenden Kaninchen No. 30, bei dem bei 0,0075 g Rosafluoreszenz vorhanden war, die aber nach der 23. Injektion bei insgesamt 0,049 g verschwunden war, und auch nach 0,1135 nicht mehr gekommen ist. Das im übrigen absolut normale Skelett leuchtet nun unmittelbar nach der Sektion unter der Quarzlampe an einigen Stellen rot auf und zwar besonders da, wo noch die Gelenkkapsel vorhanden war und Bänderreste am Knochen hingen; auch hat es den Anschein, als ob das Knochenmark nicht wie bisher bei allen Injektions- und Kontrolltieren total mattschwarz ist, sondern dunkelrot-violettfluoreszierend. Nach Ablösen der Bänder- und Kaspelfetzen und Einlegen in 20 % ig. Formalin sah man diese Erscheinungen fast nicht mehr, es leuchtet nur noch das Skelett an einzelnen Knochenpartien orangerot auf.

Die so wechselnden Befunde veranlaßten uns, weitere Versuche zu unternehmen und zwar mit bedeutend höher konzentrier-

ten Lösungen. Hammer hatte ja ganz ausdrücklich darauf hingewiesen, daß bei künstlichen Porphyrinen, d. h. bei Hämatoporphyrin, das er verwandte, mit wesentlich höheren Porphyrinmengen gearbeitet werden muß. Obwohl es uns gelungen war, auch mit den oben beschriebenen geringsten Dosen eine Fluoreszenz des Knochens zu erzielten, so reichte das doch nicht aus, um Näheres über die Art und Weise der Ablagerung zu erfahren. Weitere Versuche wurden nun mit 1 % iger Porphyrinlösung, gelöst in 1 % iger Sodalösung, unternommen. Dabei wählten wir Tiere aus, die wir ganz eingehend auf ihre Fluoreszenz an den Zähnen beobachtet hatten: Wir begannen mit den Injektionen erst, nachdem seit mindestens 8 Wochen jede Rosafluoreszenz der Nagezähne, herrührend von dem physiologisch vorhandenen Porphyringehalt der Knochen bei jüngeren Tieren, verschwunden war. Zuerst spritzten wit jeden 2. Tag 0,5 ccm, dann 1 ccm, später 2,0 — 3,0 ccm. Die ersten Fluoreszenzerscheinungen am lebenden Tier, — abgesehen von der starken Rotfluoreszenz des Abdomens im Bereich der Injektionsstellen, sahen wir nach 90 mg Injektionsmenge an den unteren Nagezähnen. Nach weiteren Injektionen konnte eine am Tageslicht sichtbare Verfärbung der Zähne im Vergleich zum Normaltier nicht beobachtet werden. Die hellen Ohren der Tiere fluoreszierten bald rosa, ebenso die gesamte behaarte Haut. Als wir unmittelbar nach der Entblutung die Tiere mit der Quarlampe untersuchten, fehlen diese letzteren Erscheinungen vollkommen. Lediglich die Zähne zeigten noch einen rosa Farbton.

Die Sektion ergab dann folgendes: Es fand sich eine weitgehende Uebereinstimmung des Befundes der verschieden lang gespritzten Tiere. Im Einzelnen konnte so festgestellt werden: Gegenüber den Kontrolltieren war ein Zurückbleiben im Wachstum deutlich: z. B. Tier No. 56 : 310 g gegen 395 g im Alter von 3 1/2 Monaten. Die Zähne und das gesamte Skelett ließen am Tagslicht keinerlei Farbdifferenzen erkennen. Im Bereich der Injektionsstellen am Abdomen fanden sich weitgehende Verwachsungen der Bauchdecken. Außerdem war hier eine auffallend starke Braunfärbung. Die Organe der Versuchstiere waren im allgemeinen etwas kleiner, durchaus entsprechend dem niedrigeren Gewicht, im Vergleich zu den Kontrolltieren. Manchmal hatte es den Anschein, als ob die dunkelbraune Leber beim Kontrolltier eher brauner, bezw. dunkler gefärbt sei als beim Normaltier. Bei der Untersuchung im Fluoreszenzlicht fiel sofort die leichte, diffuse

Rosafluoreszenz sämtlicher Darmschlingen, überhaupt aller Organe einschließlich der Muskulatur in mehr oder weniger starkem Maße auf. Besonders rot hervorstechend waren die Nebennieren.

Nach sorgfältigem Ablösen der Weichteile von den Knochen boten diese im U.-V. Licht folgendes Bild: Geringe Rosafluoreszenz gegen die Gelenkenden, id est: die Metaphyse zu, am schwächsten in der Mitte der langen Röhrenknochen. Im Schnitt deutliche Rotfluoreszenz des Knochenmarks im Schaft und zwischen den Spongiosabälkchen der Epi- und Metaphyse. Nach mehrmaligem Kratzen an der Kompakta hauptsächlich im Bereiche der Diaphyse der Knochen kamen direkt weiße Schichten zutage. Im ganzen war auffallend die wechselnde Färbung der Knochen im Vergleich zu dem gleichmäßigen Leuchten z. B. der Isouroporphyrinknochen und außerdem die geringe Intensität: schwache Rosafluoreszenz, während bei den mit I. P. gespritzten Tieren schon bei den geringsten Dosen eine Purpurfluoreszenz auftrat. Außerdem müssen wir als auffallend hinzufügen, daß wir, wie schon vermutungsweise bei den ersten Versuchen mit Hämatoporphyrin festgestellt (cfr. oben), zum erstenmal eine deutliche Rot-Fluoreszenz des Knochenmarkes feststellen konnten.

Sehr interessant war schließlich der Befund bei Tier No. 60, das nach ständigem Gewichtsverlust schließlich ad exitum gekommen war: hochgradige Abmagerung Braunfärbung überall, bes. dort wo die Injektionen verabreicht wurden. Aber auch alle Organe erschienen sehr viel brauner, als beim Kontrolltier. Am Knochen allerdings war ein Abweichen in der Farbe im Vergleich zum Normaltier nicht festzustellen. Unter der Quarzanalysenlampe hatte sich nun folgendes ergeben: starke Rotfluoreszenz aller Organe, einschließlich Haut und Muskulatur, bes. auch Zwerchfell. Die Zähne, die übrigens nach Verabreichung von 0,08 g Porphyrin am lebenden Tier schwache Rosafluoreszenz erkennen hatten lassen, fluoreszieren nicht. Die Knochen bieten folgendes Bild: starke Fluoreszenz aller Gelenkkapsel- und Bänderteile, aller noch anhaftenden Muskulatur; nach Ablösen von letzterer gerade hier, wo die Muskulatur fest am Knochen haftete: Rotfluoreszenz des Knochens; weiter auch dort, wo die den Knochen versorgenden Gefäße jeweils in ihn eintreten. An einzelnen Knochen kann man in unregelmäßigen Längsstreifen angeordnete Fluoreszenz beobachten; allerdings ließ sich an den meisten Stellen, hauptsächlich auch hier wieder in der Diaphyse, die Fluoreszenz zum Verschwinden

bringen, wenn man die oberen Periostschichten abkratzte. An diesen Stellen fand sich dann auch in der Diaphysencompakta im Querschnitt keine Fluoreszenz. Nicht zum Verschwinden zu bringen war die Fluoreszenz meist dort, wo in der Metaphyse ein Rotaufleuchten zu sehen war. Intensiv fluoreszierte das Knochenmark, ebenso, wenn auch viel dunkler rot, die Spongiosabälckchen.

Daran schlossen sich nun Auswaschversuche bei unseren positiven Versuchen nach Angaben von H. Fink an: Wir kochten die verschiedenen Knochen eine Stunde lang in 10 % ig. Sodalösung und verglichen sie dann mit den so lange in Wasser aufbewahrten Knochenstückchen des jeweils gleichen Tieres unter der Quarzlampe:

1. Teile eines Schulterplattes eines mit Isouroporphyrin gespritzten Hundes (Tier 14) die in 96 % ig. Alkohol aufbewahrt waren. Der gekochte Knochen hat oberflächlich seine Fluoreszenz weitgehend verloren, die tieferen Partien fluoreszierten noch rosa; die glasige, am Tageslicht trüb weißlich aussehende Sodalösung fluoresziert ebenfolls schwach rosa. Beim Einbringen in die Sodalösung hatte sich übrigens die Fluoreszenz der Knochen für das Auge wahrnehmbar enorm verstärkt, um erst im Verlauf der Kochperiode wieder abzunehmen.

2. Teile eines in 96 % Alkohol aufbewahrten Hämatoporphyrintieres (Tier 15): Die blaßviolette Fluoreszenzfarbe in der Metaphyse war erhalten, die Lösung war trübe, glasig, weißlich grau und fluoreszierte nicht.

3. Teile eines Hämatoporphyrinkaninchens, dessen Knochen trocken aufbewahrt waren: Die Diaphysenstückchen zeigten nach 1 ^{h} fast ebenso starke, beziehungsweise schwache Rosafluoreszenz wie die Vergleichsknochen. Die glasige trübe Lösung fluoreszierte nicht.

4. Schulterblatt eines Hämatomeerschweinchens, dessen Knochen trocken aufbewahrt waren: es fand sich vor dem Knochen nur mehr ein blaßvioletter Farbton in der gelblichen Knochenstammfluoreszenz. Nach dem Kochen zeigten sowohl die gekochten, wie die zur Kontrolle in Wasser gelegten Knochenteilchen fast ganz gleichen Farbton. Die Sodaläsung zeigte keinerlei irdendwie für Porphyrin sprechende Fluoreszenz.

5. Von Tier 56, H.-P. meerschweinchen, mit 1 % iger Lösung gespritzt, werden Knochenteile nach Trocknen in 10 % iger Sodalösung gekocht: Nach einer halben Stunde tritt eine deutlich wahr-

nehmbare Verstärkung der Fluoreszenzerscheinungen ein, die auch nach weiterem Kochen nach insgesamt 1 1/2 Stunden nicht wesentlich abgenommen hat. Es war die Fluoreszenz dieser Stückchen jetzt mindestens ebenso stark, wenn nicht stärker als die der zur Kontrolle teils in Wasser gebrachten, teils trocken gehaltenen Vergleichsstücke. Die weißlich glasige Sodalösung ist trübe und fluoreszierte nicht.

6. Durch die chemischen Untersuchungen mittels Extraktion von H. Fink und die am gleichen Objekt dann vorgenommenen fluoreszenzspektroskopischen Messungen von R. Fikentscher war festgestellt worden, daß es sich bei der als Ochronose der Schlachttiere bezeichneten Braunfärbung des Knochensystems nicht um Melanie, Chlorophyllspaltprodukte oder Haemotoporphyrine, wie früher angenommen worden war, handelte, sondern um eine echte natürliche Uroporphyrie. So bot sich uns willkommene Gelegenheit, auch Uroporphyrinknochen aus dem uns zur Verfügung gestellten Material in unsere Auswaschversuche miteinzubeziehen. DieOchronoseknochen, beiTageslicht bräunlich gefärbt, fluoreszierten im U.-V. Licht mit solcher Intensität, wie wir sie nur bei einigen unserer Isouroporphyrintieren festgestellt hatten. Dabei ist das Rot im ganzen etwas lichter, heller als die gedeckt purpurrote Fluoreszenz eines Isouroporphyrinknochens. Teile einer Compakta von langen Ochronose-Röhrenknochen wurden nach Entfettung in Alkohol-Aether in 10 % iger Sodalösung gekocht, wie oben. Die obersten Schichten zeigten darnach so gut wie keine Fluoreszenz, die tieferen Partien traten, nach Abkratzen der durch das Kochen stark erweichten oberflächlichen Knochenschichten dann wieder leuchtend zu Tage. Die Sodalösung fluoreszierte ziemlich stark rosarot; dasselbe wiederholte sich, wenn die Knochen ein zweites und drittes Mal ausgekocht wurden.

Durch spekroskopische Messung eines Knochenextraktes vor und nach Zugabe von konz. Schwefelsäure festzustellen, ob Hämatoporphyrin unverändert aufgezogen ist — was H. Fischer angeregt hatte, — konnten wir nicht vornehmen; zwar war im Salzsäureextrakt der Haematoporphyrinknochen eine Rotorangefluoreszenz zu sehen im gefilterten ultravioletten Licht; aber ein messbares Absorptionsspektrum hatten wir selbst nach wochenlanger Extraktion nicht bekommen können.

Nach unseren bisherigen Versuchen stehen sich demnach direkt gegenüber in der Wirkung einerseits das künstliche Isouropor-

phyrin und das natürliche Uroporphyrin, womit stark positive Ergebnisse erzielt wurden, andererseits das natürliche Koproporphyrin u. Deuteroporphyrin, mit welchem jeweils eine Anfärbung des Skeletts nicht erzielt worden ist; es scheint daher, daß nicht so sehr die Tatsache, daß es sich im einen Fall um ein natürliches Porphyrin handelt, im andern um ein sogenanntes künstliches, bei der Knochenanfärbung eine Rolle spielt, sondern daß wesentiche andere Faktoren mit beteiligt sein müssen. Sind es die schon mehrfach in Erwähnung gezogenen C OOH Gruppen, durch die sich die einzelnen Porphyrine unterscheiden, oder ist die Wasserlöslichkeit der in Frage stehenden Porphyrine von Einfluß auf deren Aufziehvermögen auf den Knochen? Jedenfalls weist das Ergebnis mit Hämatoporphyrin, das ganz aus dem Rahmen der gewohnten teils negativen, teils positiven Bilder fällt, darauf hin, daß jeweils ganz für das einzelne P. spezifische Verhältnisse vorzuliegen scheinen.

Die Ergebnisse dieses ersten Teiles können wir wie folgt zusammenfassen:

I. Bei der von uns angewandten Methodik der möglichsten Aseptik bei den Einspritzungen, des langsamen Beginnens mit niedrigsten Farbstoffkonzentrationen und der protrahierten Gaben ist es gelungen, mit Bruchteilen von Milligramen am Skelett wachsender Tiere Fluoreszenzerscheinungen mit Uro- und Isouroporphyrin nicht mit Deuterop. und Koproporphyrin hervorzurufen. Starke Ueberfärbnngen waren mit Isouroporphyrin leicht zu erzielen schon mit 0,04 g Isourop. Maßgebend scheint besonders das Verhältnis von Körpergewicht und Injektionsdosis zu sein.

II. Es gelingt beim Kochversuch mit 10 % Sodalösung relativ leicht, das Porphyrin aus den Ochronose-und Isouroporphyrinknochen herauszuwaschen.

III. Das Hämatoporphyrin scheint hinsichtlich seines „Aufziehvermögens" auf den Knochen jugendlicher Tiere eine besonsondere Stellung einzunehmen. Es ist festzustellen, dass einerseits die Intensität der Porphyrinablagerung viel weniger stark ist als bei den anderen positiven Versuchen; andererseits ist auch die Fluoreszenz nicht diffus gleichmässig über das ganze Skelett verteilt, sondern tritt in einer Art von Zonenbildung auf.

II.

Das durch die eben beschriebenen Untersuchungen gewonnene Material verwerteten wir zur Untersuchung der eingangs schon erwähnten Fragestellung über die Beziehungen des Porphyrins zu den Wachstumszonen. Zwar hatten sämtliche Angaben in der Literatur Uebereinstimmung darin gezeigt, daß Porphyrine sich nur im Knochensystem jugendlicher Tiere ablagern; es hat aber, soviel wir wissen, Schmorl erst als erster und einziger darauf hingewiesen, daß eine von ihm beobachtete makroskopisch festgestellte Verschiedenheit der Knochenfärbung verschiedener Wachstumszonen in einem Fall von Schweineporphyrie, die Frage nahelege, ob nicht ein Zusammenhang zwischen Wachstumsverhältnissen des Knochens und Porphyrinablagerung bestehe; ob nicht etwa dort, wo das Wachstum und damit die Einschmelzungsvorgänge am geringsten sind, sich am meisten P. ablagern würde. Allerdings betont Schmorl, daß ihm die Spezialapparatur zur genaueren Untersuchung nicht zur Verfügung stehe, weshalb er geeignete Ueberprüfung dieses Fragenkomplexes empfahl.

Wie für den ersten Teil unserer Arbeiten, so gilt hier im besonderen Maße, dass nicht makroskopisch festgestellte Braunfärbung, bezw. verstärkte oder verminderte Braunfärbung am Knochen für unsere Beurteilung der Porphyrinablagerung maßgebend war, sondern ausschliesslich die Untersuchung auf Fluoreszenz und die sich daran anschliessende Kontrolle des Spektrums. Auch für diese Untersuchungen gelangten die eingangs schon erwähnten Instrumente zur Verwendung, deren nähere Beschreibung bei Borst-Königsdörffer und M. Haitinger und der dort ausführlich angegebenen Spezialliteratur hierüber zu finden ist, zur Verwendung.

Zur Klärung dieser Fragen kamen in erster Linie unsere mit Isouroporphyrin angestellten Versuche in Frage, bei denen in ganz besonders günstigem Maße eine Farbstoffablagerung erzielt worden war.

Aus diesem Material wählten wir daher zur Bearbeitung der Wachstumfrage einige uns am geeignetsten erscheinende Tiere aus; es handelte sich zunächst um ein Isourokaninchen, Nr. 31 (im Alter von 2 Monaten, 645 g schwer, 0,047 g Isourop. gesamte Injektionsdosis). Das Skelett des sehr wohlgestalteten Tieres ist leicht mahagonibraun, eine Farbtönung, die nach längerem Liegen in Alkohol ganz intensiv zum Vorschein kommt. Bei der Betrachtung im gefilterten U.-V. Licht leuchtet das ganze Skelett purpurrot auf, die Gelenkknorpelüberzüge fluoreszieren hellblau bis blau an manchen Stellen schlägt das Rot des darunter liegenden Knochens soweit und intensiv in der Tönung durch, daß der Knorpel violett leuchtet. Im Querschnitt durch einen langen Röhrenknochen sieht man sofort, daß auch hier der Knorpel wie überall blau ist; ebenso fluoresziert der Intermediärknorpel blau. Die gesamte Knochensubstanz-Spongiosa der Epi- und Metaphyse und die Compakta der Diaphyse leuchtet im Schnitt intensiv rot auf. Das zwischen den epysären Knochenbälkchen deutlich sichtbare Knochenmark fluoresziert nicht rot, ebensowenig der Inhalt der Markhöhle.

Es hat den Anschein, als ob die Metaphyse stärker rot fluoreszieren würde, als die Epiphyse. Das Periost fluoresziert nicht. Man kann also sagen, daß die Rotfärbung diffus und gleichmässig über alles Knochengewebe verteilt ist.

Ganz anders der Befund bei den Knochen eines Isourohundes, No. 14: Der äußerst große und starke Hund läßt in seinem ganzen Knochenbefund irgendwelche Abweichungen vom gleichalten Kontrolltier am Tageslicht nicht erkennen. Auch der Schnitt durch einen langen Röhrenknochen bietet gegenüber dem durch einen Knntrollknochen nichts Abweichendes. Unter der Quarzlampe dagegen sahen wir folgendes: die vom Periost bedeckte Kompackta des Röhrenknochen fluoresziert nicht; nach Wegkratzen der Beinhaut tritt deutlich eine schöne Rosafluoreszenz zutage; Knorpelüberzug blau, in getrockneten dunkelblau-schwarz. Eine genau parallel zum J. M. K sich dicht an ihn diaphysenwärts anschliessende Spongiosabälkchenschicht von $2^1/_2$—$3^1/_2$ mm Breite leuchtet intensiv rot auf; gegen die übrigen metaphysäre Spongiosapartie verliert sich die Rotfärbung sehr stark, ebenso gegen die Compacta, die nur einige ganz schmale rot fluoreszierende Streifen zeigt, im übrigen wie die Spongiosabälkchen

olivgrünbraun fluoresziert. Die Markhöhle, daran anschliesend, ist unter der Quarzlampe total schwarz. In der Epiphyse sieht man nur eine ganz feine etwa 1 mm schmale Spongiosabälkchenzone, direkt unter dem blaufluoreszierenden Gelenkknorpel gelegen, die sich durch ihre Rosafluoreszenz deutlich von den im übrigen in ihrem olivbraunen Eigenlicht leuchtenden epiphysären Spongiosabälkchen abhebt. Das Schulterblatt des gleichen Hundes lässt insbesonders auch recht gut sichtbar werden, wie nach Wegschneiden ausgedehnter, oberflächlicher, ganz gering fluoreszierender Knochenpartien eine rote Zone sich dem Knorpelrand anschließt. Und zwar nur dort ist rote Fluoreszenz makroskopisch wahrnehmbar, während die übrige Spongiosa knochenfarben fluoresziert. Wir haben selbstverständlich noch eine ganze Reihe Knochen untersucht, und jedesmal ein gleiches Bild gesehen. Die kurzen Röhrenknochen waren insofern interessant, als sich eine Rotfluoreszenz, mit Ausnahme der ganz leichten Rosafärbung der äußeren Compacta, nur in der Metaphyse fand; manchmal konnten wir auch eine minimale Spur Rotfärbung sehen direkt subchondral des nur mit einem Knochenkern angelegten Endes. Zusammenfassend kann man also sagen, daß ganz ausschliesslich gerade die Partien eines Röhrenknochens und auch, wie wir feststellen konnten, platten Knochens (wie Schulterblatt, Beckenknochen), eine besonders starke Rotfluoreszenz, die wir als P.fluoreszenz erkannt haben, aufweisen, die das stärkste Wachstum postpartum zeigen und die als typische Wachstumszonen bekannt sind. Denn bekanntlich bilden ja die subchondral gelegenen Partien gerade durch die Umwandlung und Einschmelzung der Knorpelzellen einen Hauptlokalisationspunkt des Wachstums.

Selbstverständlich bedurfte diese auffallende und direkt in die Augen springende Erscheinung noch einer eingehenden mikroskopischen Untersuchung, um nähere und erklärende Einzelheiten feststellen zu können. Zu diesem Zwecke haben wir auf verschiedenste Weise versucht, entsprechende Präparate zu erhalten; diese mußten einerseits sehr dünn sein, durften aber andererseits in keiner Weise die ursprünglichen Ablagerungsverhältnisse irgendwie geändert darstellen. Wie wir nachweisen konnten, lösen nun alle entkalkenden Flüssigkeiten unser P. weitgehend, oft vollständig heraus. Die darauf beruhenden Einbett- und Schneideverfahren nach Entkalkung fielen also von vornherein für uns weg.

Langwierige Versuche mit Herstellung von Schliffen, von feinst gefeilten Objekten und grösseren Schnitten mit dem Rasiermesser lieferten meist unbrauchbare Präparate; lediglich bei kleineren und nicht allzuspröden Knochen gelang es, mit dem Rasiermesser einige grössere Schnitte, auf denen Epi- und Metaphyse getroffen waren, herzustellen, die zur Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop sich eigneten. Schließlich gelang es uns bei einer abgekürzten Gelatineeinbettung und insbesondere nach abgekürzter Celloidineinbettung, mit dem Gefriermikrotom brauchbare Schnitte zu bekommen. Wir hatten natürlich durch genaue Vergleiche festgestellt, daß Alkohol und Celloidin die P.ablagerungsverhältnisse nicht verändert hatten. Wenn wir uns vorher nun vergeblich abmühten, einen einzelnen Schliff oder Schnitt brauchbar anzufertigen, ohne daß das feine Netzwerk der Spongiosa allzusehr zerstört war, so ging es jetzt umgekehrt: Wir mußten mehrere Hunderte von Schnitten von jedem einzelnen Knochenteil schneiden, um dann aus dieser Masse einige gute, erhaltene und brauchbare herausfinden zu können. Denn es ist klar, dass dieses allerhärteste Knochenmaterial, wie es insbesondere die Hundeknochen ja bekanntlich sind, selbst bei vorsichtigem Einbetten und sorgfältigem Gefrieren, wenn es absolut unentkalkt ist, wie unseres, meist splittert. Auf diese Weise ist es uns geglückt, eine Reihe von Präparaten zur Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop und zur Färbung anfertigen zu können. Die Schnitte waren teilweise so dünn, dass wir im ungefärbten Präparat deutlich die Knochenzellen mit den feinen Ausläufern sehen konnten; im gefärbten Präparat waren alle Zellstrukturen, soweit sie sich überhaupt darstellen lassen, zu erkennen. Allerdings konnten wir mit den verschiedenen Färbungen, H. E., - Kossa-Silberimprägnation mit und ohne Nachfärbung, Ammoniak-Karminfärbung nach Schmorl zur Darstellung des unverkalkten Knochengewebes, die Osteoidsäume bei unseren unentkalkten Schnitten nicht immer sehr gut uns sichtbar machen. Unsere Objekte weichen natürlich von den gewohnten rotblauen Bildern bei H. E. Färbung insoferne ab, als wir es ja bei unseren Schnitten mit absolut unentkalktem Material zu tun hatten. Schnitte, vom selben Knochen, der leicht anentkalkt war und dann regulär eingebettet wurde, liessen die gewohnten Strukturverhältnisse ohne weiteres erkennen.

Die so gewonnenen Präparate eigneten sich nun tatsächlich

sehr gut für die Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung; besonders schöne Bilder bekamen wir vom Isourokaninchen No. 31. Es zeigte sich zunächst eine prächtig leuchtende, sich rot vom schwarzen Dunkelfeld abhebende Fluoreszenz des Knochengegewebes. Beim näheren Zusehen ist jedoch der ruhende und wuchernde Knorpel absolut p. frei; auch noch der säulenförmig angeordnete Knorpel. Dort aber, wo eben die erste Umwandlung in den blasig aufgetriebenen Knorpel stattfindet, dort findet sich zwischen den Knorpelzellen eine Fluoreszenz des Cewebes. Und zwar handelt es sich um ein primäres, diffuses Rotaufleuchten. Diese roten Partien sind in der Längsrichtnng angeordnet, und in den an den Säulenknorpel anschließenden Partien findet man bei sehr starker Vergrößerung, auch ein Leuchten einiger weniger Querbalken. Sowie der Einbruch der Gefäße einsetzt, werden die leuchtenden Partien breiter und nehmen die ganze Substanz eines solchen Teilchens der prov. Verkalkungszone ein.

Man sieht in dem oberen Bereich der Metaphyse, da wo doch eine streng symmetrische Anordnung der Knochensubstanz ist, teilweise ganz gefärbte Bälkchen, teilweise solche, die in der Mitte und am Rand gefärbt sind. Etwas weiter gegen die Diaphysenmarkhöhle zu hat man im Dunkelfeld bei Uvialglasfilter den Eindruck, als würden dicke rote Ränder die Knochen umschließen; deren Inneres aber zeigt eine feine Rotmarmorierung. Bei Dazuschalten von etwas Hellfeld, oder noch besser bei der Betrachtung mit Schwarzglasfilter und totalem Hellfeld sieht man nun dies: feine rote Säume oft am Rand, oft mehr im Innern eines Spongiosateiles durchziehen das Blickfeld, die Kerne im Bälkchen leuchten wie rote kleine Pünktchen und oft sieht man ein allerfeinstes Netzwerk roter Fäden teils von den Pünktchen ausgehend, teils von den roten Randsäumen kommend. Die zwischen dem Knochengewebe sich findenden restlichen Knochenmark- und Blutkörperchen fluoreszieren nicht. Die bei Tageslichtbetrachtung im Mikroskop sichtbaren braunen Schollen, oft wie Bälkchen geformt, zwischen denselben liegend oder deren Rand darstellend, haben wir im Fluoreszenzmikroskop nicht leuchtend gefunden. Dieselben Verhältnisse finden wir auch in der Epiphyse, nur das hier die Stelle des Intermediärknorpels der knorpelige Gelenküberzug einnimmt. Eine Wachstumszone mit bes. Erscheinungen, wie sie Schmorl als eventuell möglich annimmt, die sich epiphysenwärts an den M. K. anschliessen sollte,

haben wir in keinem der Fälle gefunden. Es fluoreszieren nur die sich dicht an die ruhende Knorpelzone anschließenden Spongiosabälkchen der Ephyse wie überall in der angegebenen Weise rot.

Selbstverständlich wurden diese Befunde an verschiedenen Knochen, und auch an verschiedenen Tieren wiederholt geprüft, jeweils mit demselben Ergebnis. Auch bei den auf den ersten Blick bei makroskopischer Betrachtung ein etwas anderes Bild bietenden Hundeknochen, von Hund Nr. 14 (cfr. oben) konnten wir zu demselben Ergebnis bei mikroskopischer Untersuchung gelangen, was die Verhältnisse im Bereich der Knorpel- und provisorischen Verkalkungszone betrifft. Unsere ebenso sorgfältig untersuchten Kontrolltiere ließen, wie ja schon makroskopisch, unter der Quarzlampe nicht, so auch mikroskopisch im Fluoreszenzmikroskop nicht, so auch mikroskopisch im Fluoreszenzmikroskop nichts erkennen, was auf irgendwelche Porphyrinablagerungen schließen ließe. Lediglich dieselben großen, braunen Blutschollen wurden wieder gefunden, ohne Fluoreszenz und ohne für Porphyrin typisches Spektrum. Wir müssen diesen Befunden hinzufügen, das bei vorsichtiger Anentkalkung unserer Porphyrinknochen sich das Porphyrin in demselben Maße herauslöste, als die Entkalkung zentralwärts fortgeschritten war: die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung gefärbter und ungefärbter Präparate ließ erkennen, daß dort im Innern, besonders in der Metaphyse sichtbar, wo noch kalkhaltiges Knochengewebe anzutreffen ist, auch leuchtende Fluoreszenz zu finden ist.

Eine Deutung dieser erhobenen Befunde möchten wir wie folgt vornehmen: Dort, wo Verkalkung stattfindet, in der Knorpelzwischensubstanz, findet P. Ablagerung statt. Die eingeschlossenen Knorpelgrundsubstanzreste, die sich mit Kalk imprägniert haben, als Porphyrin zugeführt wurde, sind daher porphyrinhaltig. Das zur Zeit der Porphyrinzufuhr gebildete Knochengewebe fluoresziert da, wo wir die Kittsubstanz zu suchen haben, wohin wir also auch die ersten Ansätze zur Verkalkung zu legen haben: Kittsubstanz = Trägr der Kalksalze. Es dürfte sich also bei dieser Porphyrinablagerung um einen Vorgang handeln, der zum mindesten stark parallel mit der Kalkablagerung vor sich geht, durch ähnliche Stoffwechselvorgänge bedingt ist, und an bestimmte Stoffe und Gewebe, die als ausgesprochene Porphirinfänger fungieren, gebunden zu sein scheint. Die erwähnte Schichtung der Compactafärbung dürfte mit dem Aus-

setzen der Porphyrininjektionen während verschiedener Tage zu erklären sein. Daß sich dieses Aussetzen nicht auch sichtbar in der Spongiosa ausgewirkt hat, dürfte daher rühren, daß ja hier ein dauernder Abbau- bezw. Resorptionsprozess und Appositionsprozess vor sich geht. Wir fügen anschließend hinzu, daß wir bei der roten Fluoreszenz immer auch ein Porphyrinspektrum bekommen haben.

Es dürfte wichtig sein, hier anzuführen die Feststellungen E. Derriens, die er, sosiel wir wissen, als erster gemacht hat und die Borst-Königsdörffer und auch wir wieder bestätigen können: über die normale Anwesenheit von Porphyrinen bei jungen Säugetieren, die sich im Wege der aktiven Ossifikation befinden. Er findet besonders bei neugeborenen Meerschweinchen und Katzen eine rote Fluoreszenz aller verknöcherten Skeletteile; außerdem, daß bei Ratten im Alter von 14 Tagen, wie überhaupt kurz nach der Geburt, diese Fluoreszenz klar bebeschränkt sei auf die Ossifikationspunkte, was am Schädelknochen besonders deutlich zu sehen sei. Er nimmt diese Feststellungen zum Anlaß, erneut dem Porphyrin ganz allgemein eine physiologische Rolle bei der Verkalkung zuzuschreiben. Betrachtet man noch dazu die Ergebnisse van Leersums, der Heilung der Rachitis dürch Porphyrin erzielt haben will, so scheint es uns als wahrscheinlich, das entsprechend unseren Versuchen ein enger Zusammenhahg zwischen Verkalkung und Porphyrin besteht, ebenso aber auch ein positiver Zusammenhang mit der Porphyrinablagerung und den Wachstumsverhältnissen des jugendlichen Knochens.

Zusammenfassung:

1. Es werden die aus der Literatur bekannten Porphyrininjektionsversuche zusammengestellt und über die Methodik unserer Versuche berichtet.

2. Es wird das Ergebnis der Injektionsversuche mit natürlichen und künstlichen Porphyrinen, wie Uroporphyrin, Koproporphyrin, Deuteroporphyrin, Haemotoporphyrin und Isouroporphyrin an jugendlichen Tieren besprochen.

3. Es werden durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchung Beziehungen zwischen Porphyrinablagerung einerseits und Knochenwachstumszonen und Verkalkung andererseits festgestellt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Geheimrat Prof. Dr. M. Borst für die Uebertragung der Arbeit und die vielfache Förderung und Anregung meinen herzlichsten Dank auszusprechen. Außerdem danke ich Herrn Geheimrat Prof. Dr. H. Fischer und Herrn Privatdozent Dr. H. Fink für die liebenswürdiger Weise überlassenen Porphyrine zur Anstellung der Versuche.

Litereratur.

Borst-Königsdörffer	Untersuchungen über Porphyrine. Leipzig 1929.
E. Fränkel	V. A. 249, 1924, 125
H. Hammer	V. A. 277, 1930, 159
Schmorl	V. A. 275, 129
van Leersum	Nederlandsch Tijdschrift voor Geneeskunde 1923.
H. Fischer	Hoppe-Seyler 150, 1925, 44
»	Strahlentherapie 18. 1924
»	Technische Hochschule 6/7 1927
Fischer und Heisel	Liebigs Annalen der Chemie 457, 1927, 101
H. Pflüger	Kli. Wo. R. 1931, S. 572
H. Fink	Hoppe-Seyler 202, 1931
»	» » 196, 1931
R. Fikentscher	V. A. 279 (1931) 731
M. Haitinger	Mikrochemie IX 1931 1931
W. Schulze	Ztschr. f. mikr. anat. Forschg. 13, 1928
Rabl jr.	V. A. 245, 1923, 542
Schaffer	Histologie, Leipzig 1920
E. Derrien	Comptes rendus 91. 1924
M. Borst	Naturwissenschaften 18. 1930
W. Hausmann	Bioch. Ztschr. 30, 1911
»	» » 77, 1916
»	Strahlentherapie 8, 1923
H. Kämmerer	Kli. Wo. 9. 1930, 1661

Lebenslauf.

Ich wurde als Sohn des Oberstlandesgerichtsrates, Reichsministers a. D. Erich Emminger am 13. Dezember 1907 in Augsburg geboren. Dort besuchte ich 4 Jahre die Volksschule und 9 Jahre das humanistische Gymnasium St. Stephan. Nach bestandener Reifeprüfung im März 1926 widmete ich mich dem Studium der Medizin an den Universitäten München, Berlin, Hamburg und Freiburg i. Brsg. Ich bestand die ärztliche Vorprüfung in München im November 1928 und legte im Dez. 1931 dort das medizinische Staatsexamen ab. Vom 1. Jan. bis 1. Mai arbeitete ich an der medizinischen Universitätspoliklinik in München und bin seitdem am pathologischen Institut der Universität München tätig.